

ПРОБЛЕМНАЯ СТАТЬЯ

ТЕХНОЛОГИИ МЕТАБОНОМИКИ И МЕТАБОЛОМИКИ В АНАЛИТИЧЕСКОЙ ТОКСИКОЛОГИИ

METABONOMIC AND METABOLOMIC TECHNOLOGIES IN ANALYTIC TOXICOLOGY

Г.И. Калетин, Н.И. Калетина
G.I. Kaletin, N.I. Kaletina

Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва
Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: метаболомика, метабономика, метод ЯМР, аналитическая система ВЭЖХ-ЯМР-МС, метаболические маркеры

KEY WORDS: metabolomics, metabonomics, NMR method, analytic system HPLC-NMR-MS, metabolic markers

РЕЗЮМЕ: Аналитические возможности новых технологий, в частности метабономики, позволяют изучать множественные метаболические изменения в биологических жидкостях при интоксикации.

ABSTRACT: Metabonomics is one of the new analytic technologies that facilitates the detection of various metabolic changes in biological fluids during intoxication.

*Плоть человека — свиток, на котором
Отмечены все даты бытия*

М. Волошин

*Протеины определяют активную жизнь
клетки,
в то время как нуклеиновые кислоты
представляют собой
только план этой активности*

Н.Г. Андерсон

ВВЕДЕНИЕ

Объем и качество токсикогенетической информации, имеющейся в настоящее время, позволяет вырабатывать алгоритмы критериев необходимости и достаточности генетических исследований при изучении механизма действия различных токсикантов (Waring et al., 2001, 2003; Hamadeh et al., 2002; Luhe et al., 2003; Mahlknecht et al., 2005). Изменение экспрессии генов далеко не всегда являются результатом непосредственного взаимодействия

токсикантов и ДНК, гораздо чаще — это результат взаимодействия химических агентов с белками (Арчаков, Говорун, 2002; Hamadeh et al., 2002; Mahlknecht et al., 2005). Модификации белков влияют на белковые сигнальные цепи и факторы транскрипции, которые регулируют экспрессию генов. Любой белковый продукт одного гена может существовать в многообразных формах благодаря постмодификационным видоизменениям, мутациям или образованию цепей, поэтому проявления внезапных реакций могут наблюдаться только на уровне протеома. Внешние факторы, изменяющие белковые функции, сказываются и на экспрессии генов (Введение в молекулярную медицину, 2004; Brett et al., 2001; Feng et al., 2002; Evans, McLeod, 2003; Amin et al., 2004).

Токсикологическая оценка риска причинения возможного вреда опирается на многофакторную и обязательно количественную информацию о характере и действии химических веществ на организм и является элементом системы обеспечения химической безопасности, социально-гигиенического и экологического мониторинга.

ПОСТГЕНОМНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ: МЕТАБОЛОМИКА И МЕТАБОНОМИКА

Постгеномные технологии — протеомика, геномика, метаболомика, метабономика имеют большие возможности для определения качественных и количественных изменений метаболических процессов в организме человека при действии токсикан-

тов и факторов окружающей среды (Selman et al., 2006; The Handbook of Metabonomics and Metabolomics, 2007; Wang et al., 2007; Rezyu et al., 2009).

Протеомика изучает полный набор белков, производимых конкретными типами клеток. Технология протеомики включает определение числа, структуры синтезированных организмом белков, их последовательности белок—белок и посттрансляционных модификаций последовательности белок — другая молекула при взаимодействии внутри клетки. Протеом является понятием, описывающим все эндогенные белки. Метаболом представляет собой совокупность всех небольших молекул или метаболитов в органелле, клетке, ткани, органе или организме. Геном определяет возможную структуру метаболома, а метаболом воздействует (положительно или отрицательно) на экспрессию этой структуры.

Генетический код генерирует сигналы (транскриптом), которые определяют состав протеома, последний в свою очередь устанавливает каталитические факторы метаболизма. Регуляция взаимодействий циклична, так как по существу метаболом регулирует геном посредством специальных белково-метаболических взаимодействий, которые прямым или косвенным путем контролируют генную транскрипцию. Окружающая среда, лекарства и продукты питания, которые могут содержать ксенобиотики, в том числе токсичные вещества, взаимодействующие с ДНК, мРНК и белками, определяют конечную метаболическую структуру биологических систем, тогда как геном и протеом определяют лишь возможную структуру метаболома.

Определения терминов «метаболомика» и других «омиков» не являются строгими в научном смысле. Понятие «метаболом» впервые обсуждалось в книге «Effect of Slow Growth on Metabolism of *Escherichia coli*, as Revealed by Global Metabolite Pool (metabolom) Analysis» в 1998 г. Метаболомика является системой технологий, направленных на объяснение и изучение метаболомов. Подобно геномам и протеомам, существуют метаболомы, содержащиеся как в клетках одноклеточных организмов, так и в клетках тканей многоклеточных организмов. В метаболомах биологических жидкостей человека и животных можно обнаружить различные метаболиты при нормальных метаболических процессах и при воздействии токсикантов на организм (Nicholson et al., 1999).

Начиная с 2002 г. активно развивается метаболомика — новая технология количественного измерения динамического мультипараметрического метаболического ответа живых систем на патофизиологические или генетические изменения (Колоколова и др., 2008; Nicholson et al., 2002). Токсические эффекты, генетические и соматические заболевания могут проявляться нарушением синтеза некоторых белков, однако в конечном счете происходит изменение управления биохимически-

ми процессами, что отражается на соотношении концентраций многих эндогенных веществ в потоках биологических жидкостей (Nicholson et al., 1985, 1989, 1999, 2001, 2002; Holmes et al., 1998; Lindon et al., 2001; Albert, 2002; Carvalho et al., 2002; Rossi, Sinz, 2002; Wagner et al., 2002; Willoughby et al., 2002).

Нарушение динамического равновесия в биологических жидкостях организма, вызванное интоксикацией или заболеванием, изменяет их качественный и/или количественный состав. Для установления факта происходящих изменений необходимо в плазме крови, моче или желчи определить одновременно множество метаболитов в широком диапазоне концентраций.

В настоящее время с целью получить ответ на вопрос «Чем различаются белки поврежденной и нормальной клетки?» часто используют рутинный метод — двухмерный гель-электрофорез, имеющий низкую воспроизводимость, трудности автоматизации и другие существенные ограничения.

Новые технологии метаболических исследований используют систему комбинированных методов — систему ВЭЖХ-МС-ЯМР (высокоэффективная жидкостная хроматография — масс-спектрометрия — ядерный магнитный резонанс). Есть два подхода к применению ЯМР для определения метаболитов. Первый подход, объединенный общим названием «метаболомика», — это обнаружение и идентификация всех эндогенных соединений и метаболитов ксенобиотиков (в том числе токсикантов) (Tweeddale, 1998). Вторым — это обнаружение и идентификация в биологических жидкостях эндогенных соединений и метаболитов ксенобиотиков (в том числе токсикантов), характеризующих конкретное патологическое состояние (интоксикацию) организма, а также построение моделей таких состояний. Вторым подходом разработан D. Nicholson с сотр. и назван «метаболомика» (Nicholson et al., 1985, 1989, 1999, 2001, 2002; Lindon et al., 2000; Kristal et al., 2002; Selman et al., 2006; Wang et al., 2007). Видимое различие между метаболомикой и метаболомикой состоит в том, что метаболомика — это изучение метаболизма в клетке и ткани, а метаболомика — это подход к изучению метаболизма при использовании биологических жидкостей как индикаторов происходящих патологических процессов. В любом случае важно ответить на ключевой вопрос токсикологии: какой биохимический вред нанесен клетке и как это связано с определенным патологическим состоянием?

«Метаболическое профилирование» и «биохимическое профилирование» — также широко используемые термины для описания метаболических исследований. Метаболическое профилирование является способом определения качества и/или количества небольших молекул в биологическом образце. Анализ может включать один или несколько технологических приемов, таких, как высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), газовая хроматография (ГХ), капилляр-

ный электрофорез (КЭФ), масс-спектрометрия (МС) и ядерный магнитный резонанс (ЯМР). Ранее профилирование эндогенных метаболитов сводилось к определению специфических соединений или типов соединений: получали «снимок» уровня метаболитов в определенное время и в определенном состоянии. Например, после приема красного вина находящиеся в моче органические кислоты (или в крови флавоноиды) можно обнаружить несколькими методами — ГХ-МС, ВЭЖХ-МС или ЯМР. В настоящее время метаболическое профилирование рассматривается уже в составе (системе) метаболома. Пока это трудновыполнимо, но ученые пытаются найти пути подобного определения. Проблема заключается в разработке единых (стандартных) аналитических методик определения и регистрации результатов при исследовании биологических объектов. Во многих токсикологических исследованиях в результате мониторинга процессов, происходящих в организме в ответ на действие токсикантов, отмечается, что изменения в метаболизме предшествуют гистологическим изменениям. Возможность определения однозначных индивидуальных ответных реакций до получения достоверно фиксированных токсикологических или гистологических реакций принесет несомненную пользу пациентам.

В настоящее время и для разработки новых лекарств применяются метаболомические исследования. Так, в США, Японии и Евросоюзе созданы небольшие компании с целью выполнения различных метаболомических анализов для более крупных фармацевтических фирм. Одна из задач этих компаний заключается в быстром получении ранних метаболомических маркеров токсичности (или безопасности) лекарств, что может использоваться для оценки качества и безопасности новых лекарственных средств. Другая задача заключается в открытии новых метаболомических маркеров, образующихся в организме человека в ответ на действие лекарств, которые могут в дальнейшем использоваться для выявления людей, реагирующих на то или иное вещество особым образом. По существу новые технологии — метаболомика и метабономика — ускоряют процесс создания лекарств и значительно увеличивают шансы на безопасное и эффективное их применение, потому что позволяют отличить «нормальный» метаболизм от «измененного».

Для детального анализа соединений в биологических жидкостях применяется двухмерная (2D) ЯМР-спектрометрия, которая предоставляет корреляционную информацию, показывающую взаимосвязи резонансов ядер различных атомов в молекуле (Токсикологическая химия, 2008 и 2010). Анализ данных 2D отвечает на вопросы:

- соответствуют ли резонансные пики протонам отдельной или разных молекул;
- расположены ли протоны близко друг к другу в молекулах;

- расположены ли протоны близко друг к другу в пространстве;
- можно ли соотнести конкретный резонанс или мультиплет резонансов к конкретному протону в соединении.

Существует много разных вариантов 2D ЯМР-анализа, и полученные результаты зависят от того, каким из них был проведен анализ. Одним из наиболее распространенных 2D ЯМР-методов является корреляционная спектроскопия (Correlated Spectroscopy — COSY), с помощью которой получают перекрестные пики для двух ядер. Например, кросс-пики показывают, что два протона находятся в одной и той же молекуле.

Другим распространенным видом 2D ЯМР-методов является ядерный эффект Оверхаузера (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy — NOESY). В этом случае интенсивности кросс-пигов больше зависят от расстояния между парой взаимодействующих ядер в пространстве, чем от структуры молекул. Поэтому метод NOESY применяется в основном для определения отдельных протонов или метильных групп. Метод NOESY дает информацию о конформации молекулы и является ключевым элементом при определении структуры молекулы, например структуры белков в растворах. Третий тип 2D ЯМР-методов связан с разными видами ядер, например резонанс ^{13}C с резонансом ^1H . Чаще применяется вариант этого метода — HSQC (Heteronuclear Single-Quantum Coherence), который коррелирует спектр ^1H со спектром ^{13}C .

Спектры COSY, NOESY и HSQC более трудны для интерпретации и требуют специальных знаний, однако значительно информативнее метода ЯМР ^1H .

В ЯМР-исследованиях (метаболомических) полученные данные нередко представляют графическими способами. Каждая биологическая жидкость, анализируемая методом ^1H ЯМР-спектрометрии с частотой 800 МГц, имеет свой характерный спектр, что делает возможным идентифицировать нарушение метаболомических профилей. Получают спектральные картинки, отнесенные к тому или иному метаболу (условно их можно сравнить с характерными паттернами на биочипах). С этой целью используют специальные компьютерные программы для проведения анализа основных компонентов (АОК) и классифицируют образцы согласно их ЯМР-спектральным профилям (Jones et al., 2002; Sim et al., 2002). В настоящее время эффективный способ извлекать значащую метаболомическую информацию состоит в комбинировании результатов ЯМР-спектрометрии высокого разрешения определяемой биологической жидкости с мультивариантными методами статистики. Основные компоненты (ОК) — новые переменные, созданные от линейных комбинаций стартовых спектральных данных так, что каждый последующий ОК имеет определенное отличие от предыдущего, причем первый ОК

в сравнении с другими имеет разницу в наборе данных в наибольшей степени. Участок первых двух или трех ОК дает лучшее представление о разновидности набора данных в двух или трех измерениях. Так создаются карты ОК, которые могут визуальнo отразить поведение образцов под влиянием любого токсиканта. «Рисунок» ЯМР-спектра биологической жидкости определен его метаболическим профилем (Carvalho et al., 2002; Jeffrey et al., 2002; Watkins et al., 2002). Это достаточно простой подход для научных исследований. Однако в условиях протекания биохимических процессов *in vivo* все значительно сложнее, поскольку эффекты, вызванные генетической модификацией, болезнью, пищей, образом жизни, действием введенного препарата, развиваются в режиме реального времени. Для решения подобных многофакторных задач разработаны (и активно разрабатываются) автоматические методы классификации метаболических данных, на основе которой строится математическая модель, предсказывающая правильный выбор класса для каждого образца. Расчетные данные сравнивают с экспериментально полученным ЯМР-метаболическим профилем (Deprez et al., 2002; De Young et al., 2002; Fiehn et al., 2002; Nicholson et al., 2002). Методика позволяет количественно описать статистические границы, которые характеризуют каждый класс образца в терминах их метаболических профилей, и отличить образцы, которые не принадлежат ни к одному из классов. Исследуемый образец может быть отнесен как к единственному классу, так и ко многим классам. Построив исчерпывающий ряд моделей, можно предусмотреть классификацию для широкого диапазона образцов биообъектов. В настоящее время благодаря возможностям такого подхода установлены биомаркеры токсических повреждений, вызванных рядом ксенобиотиков; генетических повреждений; нежелательных побочных эффектов лекарственных препаратов и пестицидов, а также фенотипов (метаботипов), сформированных в результате взаимодействия генотипов с внешней средой.

С помощью ЯМР-анализа были расшифрованы и уточнены многие метаболические процессы — от биосинтеза коферментов в микробах и регуляции метаболизма глюкозы у млекопитающих до реакций переноса метильной группы в структуре метаболита при токсических поражениях печени. Методом ^1H ЯМР-спектроскопии можно обнаружить очень тонкие изменения в минорных метаболитах.

Как указано выше, цель метабономики состоит в установлении полного набора малых молекул, присутствующих в биологической жидкости. Многие соединения молекулярной массой 1000—1500 Да являются пептидами и конъюгатами кофермента А. Среди соединений молекулярной массой менее 1500 Да большинство находятся в интервале 100—600 Да. К тому же многие макромо-

лекулярные структуры (например, мембраны) состоят из плотно, но динамично связанных небольших молекул. Поэтому задача аналитика состоит в том, чтобы доступными способами определить качественные изменения метаболитов, различающихся молекулярной массой, поляризацией, зарядом, устойчивостью и т.д. Поэтому растет популярность комбинированного метода ВЭЖХ-ЯМР для идентификации компонентов биожидкостей. Миниатюризация аппаратуры и возможности измерения пикомолярных количеств образца привлекают в настоящее время большое внимание. Уже существуют экспериментальные системы для ВЭЖХ-ЯМР, соединенные с Фурье-преобразователем, ИК- и масс-спектрометрами. В будущем такие системы дадут возможность анализировать смеси добавок полимера или идентифицировать *in vivo* неизвестные компоненты, не изолируя их в индивидуальном виде.

Определение компонентов в сложных биоматрицах проводят в объединенных аналитических системах ВЭЖХ-ЯМР-МС, что дает возможность быстрой полной и надежной молекулярной идентификации. Длина и направление капиллярных трубок в системе могут быть отрегулированы так, чтобы или ЯМР-спектрометр, или масс-спектрометр сначала обнаружил элюат. Например, масс-спектрометр может помешать первоначальной идентификации ^{19}F ЯМР-сигнала, идущего от определяемого образца, тогда ЯМР-спектрометр размещают перед масс-спектрометром.

В настоящее время существует несколько методик, позволяющих использовать системы ВЭЖХ-ЯМР. Самая простая из них — обнаружение веществ по ЯМР спектрам в режиме реального времени как непрерывного потока хроматографических пиков элюата (практически для обнаружения используют только ^1H или ^{19}F ЯМР-спектрометры).

По другой методике сохраняют часть элюата в капиллярных петлях для более позднего автономного изучения ЯМР-спектра (выбор пика). Кроме того, поток может быть приостановлен в коротких интервалах времени при пропуске его через ячейку ЯМР («разрезание» времени) аналогично использованию диодного множества УФ-датчика. Такая методика позволяет получить спектры от различных частей хроматографического пика. «Разрезание» времени наиболее полезно, если разделение происходит недостаточно и трудно определить времена удерживания. В современных приборах проводят полностью автоматизированный анализ, который, однако, может быть приостановлен в любое время с возвращением к «ручному» контролю. ЯМР-спектры биологических образцов чрезвычайно сложны и содержат много тысяч резонансных поглощений. Получить максимальную информацию (например, установить фрагменты гидроксильного метаболита или глюкуронида токсиканта) с помощью системы

ВЭЖХ-ЯМР-МС можно при использовании специальных математических приемов — мультивариантной статистики.

Предел обнаружения и количественное определение вещества зависят как от природы определяемых молекул, так и от класса технической сложности оборудования (например, разрешения соответствующего ЯМР-спектрометра). Возможности современных ЯМР-спектрометров ограничены определением метаболитов с концентрацией $\geq 0,1 \text{ мМ}^{-6}$. Предел обнаружения в методе ВЭЖХ-МС зависит от концентрации, степени ионизации компонента и технологического приема исследования иона. С помощью современных систем можно обнаружить субпикомолярные количества вещества в 1 мкл образцов. Фактором, ограничивающим обнаружение ионов, является ионизация молекул в водном растворе. Степень ионизации для определенной молекулы различается в разных образцах. На исследуемый ион влияют солевые и буферные растворы. Ионизация молекул может быть подавлена другими ионами при одновременном присутствии. Все это должно быть проконтролировано и учтено при анализе.

Применение той или иной аппаратуры для метаболических исследований зависит от цели исследования, в частности от того, является ли задачей исследования полная характеристика метаболической структуры данного образца или сравнительный метабономический анализ. В первом случае оптимальным является использование наиболее чувствительных спектрометров сильного магнитного поля и особых методик. В ряде случаев для определения метаболитов с низким содержанием в пробе может потребоваться комбинированный метод ВЭЖХ-ЯМР. Сравнительные метабономические исследования различных образцов, в которых концентрации солей, белков, величина рН и другие параметры варьируют в ограниченной степени, могут проводиться с помощью спектрометра низкого поля, однако при этом увеличивается общее время исследования. Например, при 300 МГц общее время исследования для достижения нужного уровня чувствительности увеличивается в 4,6 раза по сравнению с исследованием, проведенным при 500 МГц.

Для полного метаболического анализа из всех хроматографических детекторов масс-спектрометры имеют наибольшее значение. В метабономических исследованиях применяют различные варианты МС, например лазерную десорбционную ионизацию — MALDI или электроспрейную ионизацию — ESI. Методы ионизации APCI (химическая ионизация при атмосферном давлении) и ESI используются для перевода полярных метаболитов в масс-спектрометре из водных растворов в ионы газовой фазы. Как правило, многие гетероатомы и функциональные группы (например, COOH и NH₂), которые содержат молекула, склонны к ионизации с помо-

щью APCI. Однако APCI не позволяет произвести полную ионизацию всех типов биомолекул. Ионизацию можно увеличить при добавлении некоторых летучих буферов к растворителю (например, уксусная, муравьиная кислоты, трифторуксусная кислота и ацетат аммония). ESI-МС — самый распространенный метод исследования биомолекул, который можно использовать с различными масс-анализаторами, такими, как квадруполь, ТоF (времяпролетный) или резонанс-Фурье-преобразователь — FT. Важно, что ТоF обеспечивает экспрессность, высокую точность и разрешение. Однако метод ТоF-МС имеет некоторые ограничения предела обнаружения, которые зависят от природы соединений. Квадрупольные масс-анализаторы из-за способности мониторировать ионы, используя тандемную МС (МС-МС), на сегодняшний день являются золотым стандартом чувствительности и предела обнаружения. Метод FT-МС имеет высокую разрешающую способность и дает четкие пики. Однако он сложен и применяется редко; понадобится время, для того чтобы FT-МС стал методом выбора при метаболических исследованиях (Токсикологическая химия, 2008, 2010).

Для определения метаболитов, обладающих окислительно-восстановительными свойствами, в биологических образцах, таких, как нейромедиаторы, флавоноиды в плазме, эндогенные антиоксиданты в плазме и метаболиты митохондрий, используются способы высокочувствительного электрохимического детектирования в ВЭЖХ. В зависимости от структуры и природы конкретного метаболита чувствительность метода находится в пределах 5—10 пикограммов.

Эффективность работы систем ВЭЖХ-ЯМР-МС можно подтвердить примером. В нескольких крупных медицинских центрах США был проведен анализ 62 метаболитов мочи пациентов, отобранных в группы по определенным показателям. Метод дал количественные данные (с отклонениями < 15%) для большинства метаболитов и достоверно идентифицировал 105 из 108 больных с наследственными метаболическими заболеваниями (Nicholls et al., 2001; Albert, 2002).

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ

Получены сведения о многих метаболических маркерах, идентифицированных при исследовании мочи и других биологических жидкостей с помощью современных технологий (Nicholson et al., 1985; Chace et al., 2001, 2002; Pitt et al., 2002; Han et al., 2003). Например, при изучении в эксперименте токсичности HgCl₂, а также этилртути (Калетин и др., 2010) наблюдали значительное повышение содержания янтарной, молочной и уксусной кислот и этанола. Изменение концентрации этанола связывают со снижением активности алкогольдегидрогеназы (McGehee et al., 1994; Waters et al., 2002). Диф-

ференцирующими метаболитами для определения степени токсического эффекта ртути являются валин, таурин, глюкоза и оксид триметиламина (ТМАО). Последний является общим биомаркером почечной токсичности и идентифицируется при действии других нефротоксикантов.

Важно отметить влияние кишечной микрофлоры на метаболические процессы (Gonzalez-Sastre et al., 1988; Espina et al., 2001). Кишечные бактерии обладают изменчивой восприимчивостью к лекарствам и токсикантам. Участие кишечной микрофлоры в синтезе метаболитов мочи зависит от их природы. Кишечные бактерии играют большую роль в метаболизме метиламина. Образование триметиламина (ТМА) из холина главным образом происходит с помощью кишечных бактерий, тогда как последующее окисление в ТМАО преимущественно происходит в печени. Образование ТМАО является примером сложных метаболических взаимодействий, которые должны рассматриваться с целью адекватной оценки результатов метаболомических анализов. У пациентов с хронической почечной недостаточностью часто происходит чрезмерно быстрый рост кишечных бактерий. Это способствует пониженному пищевому статусу больных, особенно нуждающихся в постоянном диализе. В организме повышаются уровни диметиламина (ДМА) и его канцерогенного метаболита — нитрозодиметиламина (НДМА). Следовательно, повышенный уровень DMA и НДМА в моче может служить маркером действия почечного токсиканта. Однако различные почечные токсиканты по-разному влияют на рост кишечных бактерий, поэтому важно знать, как изучаемое соединение реагирует с кишечной флорой. Пока затруднительно ответить на вопрос, каким образом сопоставить уровень DMA как маркера метаболической активности кишечных бактерий и уровень DMA, зависящий от поступления холина из пищи и других источников, которые могут служить предшественниками синтеза метиламина.

Еще одним примером служит идентификация пироглутамата (5-оксопролина) как маркера токсического действия высоких доз парацетамола (N-ацетил-п-аминофенола). Накопление пироглутамата, несомненно, связано с метаболизмом серосодержащих аминокислот, так как процесс может быть остановлен введением метионина, который опосредованно используется организмом как сульфатный и цистеиновый конъюгат парацетамола (Jeffrey et al., 2002; Xu et al., 2002). В ^1H ЯМР-спектре мочи были обнаружены резонансные характеристики обоих конъюгатов, а также парацетамола глюкуронида. Таким образом, было показано, что 5-оксопролинурия является следствием недостаточного количества серосодержащих аминокислот и может служить биомаркером других химических агентов, которые снижают содержание серосодержащих аминокислот.

A.W. Nicholls с сотр. (Nicholls et al., 2001) изучали образцы мочи людей, подвергавшихся хроническому производственному отравлению гептилом (ракетное горючее) в течение нескольких месяцев, с помощью системы ВЭЖХ-ЯМР. Результаты экспериментов показали повышение уровня 2-аминоадипата, β -аланина, цитруллина, N- α -ацетилцитруллина и аргининсукцината, что можно считать обнаружением биомаркеров токсического эффекта несимметричного диметилгидразина.

Исследователи отмечают встречающиеся противоречия в информации о биомаркерах (метаболитах токсикантов в моче), полученной за последние 10 лет с помощью новых технологий и ранее — традиционными методами.

Малотоксичные вещества могут вызывать временные нарушения метаболизма без нанесения большого вреда тканям и органам, но чувствительный прибор зафиксирует метаболический профиль, отличающийся от принятой нормы. Поэтому интерпретировать результаты анализа необходимо с учетом наиболее полной информации о пациенте.

Определение концентраций основных метаболитов является целью метаболических анализов, однако не менее важным и вполне информативным может быть изучение того или иного метаболита в условиях конкретного организма *in vivo*. Такие анализы включают использование прекурсоров, меченных изотопами, и исследование образцов определенных метаболитов, меченных изотопами. Соединения, похожие по структуре, но имеющие разный состав изотопов, называются изотопомерами. Использование стабильного изотопа ^{13}C , принимая во внимание его распространенность в природе (всего 1,1%), обеспечивает надежность результатов анализа. Методом ЯМР-спектрии можно определить расположение изотопа в изучаемом соединении, так как каждый изотопomer показывает определенный ЯМР-спектр (Burgess et al., 2001; Jeffrey et al., 2002).

Определение состава изотопмера возможно с помощью как прямой одномерной, так и двумерной ^{13}C ЯМР-спектрии, чаще применяется вариант 2D ЯМР-методов HSQC.

Для изучения метаболизма дейтерированных субстратов применяют 2D ЯМР. Положительная сторона этого подхода заключается в относительной легкости проведения исследований и низкого распространения дейтерия в природе по сравнению, например, с ^{13}C . Метод 2D ЯМР использовали для изучения печеночного метаболизма (London, Gabel, 1988; Farran et al., 1993; Akira et al., 1994; Jones et al., 2001). Так, при исследовании метаболизма L- и D-[метил- $^2\text{H}_3$]метионина ([метил- D_3] метионина) с помощью 2D ЯМР *in vivo* можно проследить биотрансформацию того или иного изомера, используя специальную поверхностную спираль, помещенную на печень анестезированных крыс. Например, была обнаружена ре-

акция трансметилирования, приводящая к образованию [метил- D_3]саркозина, что позволило определить активность метионинаденозилтрансферазы и глицин-N-метилтрансферазы. В течение времени некоторые другие метаболиты также становятся дейтерированными из-за действия ферментов, вовлеченных в процессы метаболизма. Одни из дейтерированных саркозинов окисляются в митохондриях с помощью саркозидегидрогеназы, в конечном счете превращаясь в дейтерированную воду, однако некоторое количество может экскретироваться. Интересно, что аналогичные исследования, в которых использован прекурсор дейтерированного D-метионина, дали по существу такие же результаты, показывающие быстрое превращение D- в L-изомер. Сравнение метаболизма L- и D-[метил- D_3]метионина показало, что результаты могут меняться под воздействием бензоата натрия, ингибитора D-аминоксидазы. Преобразование D-метионина в L-метионин, в котором участвует этот фермент, сопровождается обратным аминированием, которое катализируется ферментом глутаминазой II. Было отмечено уменьшение количества L-метионина при введении бензоатов, что, возможно, связано со снижением уровня глицина, так как последний используется в этом случае для образования гиппурата из бензоата. Снижение уровня глицина уменьшает его активность в реакции образования глицин-N-метилтрансферазы, что опосредованно ведет к уменьшению количества L-метионина. Обнаруженные *in vivo* с использованием метода поверхностной спирали дейтерированные метаболиты печени были определены и в моче с помощью 2D ЯМР. Применяя указанную выше технологию, можно исследовать эффекты специфических химических веществ в метаболических путях.

Следует еще раз обратить внимание читателя на то, что классический аналитический подход к определению содержания метаболитов в биологических системах с использованием внутренних стандартов и построением калибровочных графиков практически неприменим для полных исследований сложных метаболомов. Автоматический анализ данных при определении метаболических характеристик возможен с помощью специальных опознавательных компьютерных программ, коррелирующих результаты исследований многоаспектного набора данных (например, значения хроматографических времен удерживания, интенсивности масс- и ЯМР-спектров). Масштабы сокращения времени получения массива данных огромны. С помощью метода ВЭЖХ-ЯМР-МС-ToF в течение 20 мин (со скоростью 5 спектров/с) можно создать 6000 характерных МС- и ЯМР-спектров, каждый из которых включает более 50000 точек. Задача состоит в том, чтобы выделить все реальные масс-спектральные и ЯМР-характеристики для более 1000 потенциальных метаболитов, раз-

деленных хроматографически (т.е. в каждой хроматограмме). Одним из способов визуализации и анализа данных является создание контурных графиков, на осях которых указаны аналитические сигналы методов. Различия в контурах от образца к образцу отражают изменения в метаболических путях. При этом необходимо иметь информацию о том, какому (острому или хроническому) воздействию токсиканта подвергся обследуемый. В некоторых случаях краткосрочные изменения метаболизма при остром отравлении могут быть противоположны этим же изменениям, наблюдаемым у пациента при длительном воздействии токсиканта.

В клинической диагностике метаболических изменений применение комплекса ВЭЖХ-ЯМР-МС позволило определить липопротеины плазмы крови. Методом ЯМР-спектрометрии получили индивидуальную характеристику каждого липопротеина, согласно их разделению на липопротеины высокой плотности, липопротеины низкой плотности (ЛПНП) и липопротеины очень низкой плотности, имеющих небольшое различие между собой, заключающиеся в разном диаметре фосфолипидного слоя в оболочках липопротеинов (Osborne et al., 2000; Shockcor, Holmes, 2002; Sim et al., 2002; Watkins et al., 2002), что позволяет безошибочно диагностировать и прогнозировать течение коронарных заболеваний. Результаты этих исследований были полезны при определении механизма повреждающего действия токсикантов, оказывающих влияние на метаболизм липопротеинов, мобилизацию гликогена, стадии глюкогенеза и другие процессы, происходящие в организме в режиме реального времени (Tate et al., 2001; Seshadri et al., 2002; Shi et al., 2002; Selman et al., 2006; Wang et al., 2007; Rezzzy et al., 2009).

Несмотря на многие вопросы, еще требующие ответа исследователей, и несовершенство аналитических технологий, метабономический анализ произвел революционный прорыв в токсикологии и фармакологии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Процессами метаболизма клеток управляет сложная сеть молекулярных взаимодействий, определяющая уровни экспрессии различных генов.

Изучение динамики метаболических процессов, происходящих в клетке, и природы метаболитов является частью исследования структурной организации сетей метаболических потоков и основой выявления принципов их регуляции.

Технологии метаболомики и метабономики, в частности использование аналитических систем ВЭЖХ-МС-ЯМР, позволяют определить интерактивную природу клеточных реакций на химические агенты и опасность развития нежелательных побочных эффектов лекарственной терапии в зависимости от индивидуального гено- и фенотипа.

ЛИТЕРАТУРА

Арчаков А.И., Говорун В.М. Генный полиморфизм и проблемы токсикологии // Материалы II съезда токсикологов. М., 2002. С. 3—4.

Введение в молекулярную медицину / Под ред. М.А. Пальцева. М.: Медицина, 2004. 496 с.

Калетин Г.И., Калетина Н.И., Брусиловский А.И. Технология «капиллярный электрофорез — ИСП-МС» в метабомике // Вестник ОГУ. Приложение «Биоэлектробиология». 2006. № 12 (64). С. 114—116.

Колоколова Т.Н., Савельев О.Ю., Сергеев Н.М. Метаболический анализ биологических жидкостей человека с помощью спектроскопии ЯМР 1H (обзор) // Аналит. химия. 2008. Т. 63. № 2. С. 118—136.

Токсикологическая химия. Аналитическая токсикология. Учебник для вузов / Под ред. Р.У. Хабриева, Н.И. Калетиной. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 752 с.

Токсикологическая химия. Метаболизм и анализ токсикантов / Под ред. Н.И.Калетиной. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. 1016 с.

Akira K., Farrant R.D., Lindon J.C., Caddick S.T., Nicholls A.W., Nicholson J.K. High-field deuterium nuclear magnetic resonance spectroscopic monitoring of the pharmacokinetics of selectively deuterated benzoic acid in man // Anal Biochem. 1994, 221:297—302.

Albert K. (ed). On-line LC-NMR and Related Techniques. Wiley, U.K., 2002. 306 p.

Amin R.P., Vickers A.E., Sistare F., Thompson K., Roman R.J., Lawton M., Kramer J., Hamadeh H.K., Collins J., Grisom S., Bennett L., Tucker C.J., Wilde S., Oreffo V., Davis J., Curtiss S., Naciff J., Cunningham M., Tennant R., Stevens J., Car B., Bertram T.A., Afshari C.A. Determination of putative gene based markers of renal toxicity / EHP Toxicogenomics. 2004.

Brett D., Kemmner W., Koch G., Roefzaad C., Gross S., Schlag P.M. A rapid bioinformatic method identifies novel genes with direct clinical relevance to colon cancer // Oncogene. 2001, 20(33):4581—4585.

Burgess S.C., Carvalho R.A., Merritt M.E., Jones J.G., Malloy C.R., Sherry A.D. ¹³C-isotopomer analysis of glutamate by J-resolved heteronuclear single quantum coherence spectroscopy // Anal Biochem. 2001, 289:187—195.

Carvalho R.A., Jones J.G., McGuirk C., Sherry A.D., Malloy C.R. Hepatic gluconeogenesis and Krebs cycle fluxes in a CC14 model of acute liver failure // NMR Biomed. 2002, 15:45—51.

Chace D.H. Mass spectrometry in the clinical laboratory // Chem Rev. 2001, 101:445—477.

Chace D.H., Kalas T.A., Naylor E.W. The application of tandem mass spectrometry to neonatal screening for inherited disorders of intermediary metabolism // Annu Rev Genomics Hum Genet. 2002, 3:17—45.

De Young M.P., Damania H., Scheurle D., Zylberberg C., Narayanan R. Bioinformatics-based discovery of a novel factor with apparent specificity to colon cancer // In Vivo. 2002, 16(4):239—248.

Deprez S., Sweatman B.C., Connor S.C., Haselden J.N., Waterfield C.J. Optimisation of collection, storage and preparation of rat plasma for H-1 NMR spectroscopic analysis in toxicology studies to determine inherent variation in biochemical profiles // J Pharm Biomed Anal. 2002, 30:1297—1310.

Espina J.R., Shockcor J.P., Herron W.J., Car B.D., Contel N.R., Ciaccio P.J., Lindon J.C., Holmes E., Nicholson J.K. Detection of in vivo biomarkers of phospho-lipidosis using NMR-based metabonomic approaches // Magn Res Chem. 2001, 39:559—565.

Evans W.E., McLeod H.L. Pharmacogenomics — drug disposition, drug targets and side effects // The New England Journal of Medicine. 2003, 348(6):538—549.

Farrant R.D., Salman S.R., Lindon J.C., Cupid B.C., Nicholson J.K. Deuterium NMR spectroscopy of biofluids for the identification of drug metabolites — application to N,N-dimethylformamide // J Pharm Biomed Anal. 1993, 11:687—692.

Feng J., Li X., Pei F., Chen X., Li S., Nie Y. ¹H NMR analysis for metabolites in serum and urine from rats administered chronically with La(NO₃)₃ // Anal Biochem. 2002, 301:1—7.

Fiehn O., Kopka J., Dormann P., Altmann T., Trethewey R.N., Willmitzer L. Metabolite profiling for plant functional genomics // Nat Biotechnol. 2000, 18:1157—1161.

Fiehn O. Metabolomics—the link between genotypes and phenotypes // Plant Mol Biol. 2002, 48:155—171.

Gavaghan C.L., Holmes E., Lenz E., Wilson I.D., Nicholson J.K. An NMR-based metabonomic approach to investigate the biochemical consequences of genetic strain differences: application to the C57BL10J and Alpk: ApfCD mouse // FEBS Lett. 2000, 484:169—174.

Gonzalez-Sastre B., Mora J., Guillamat R., Queralto J.M., Alvarez E., Udina C., Massana J. Urinary phenylacetic acid excretion in depressive patients // Acta Psychiatr Scand. 1988, 78:208—210.

Goto S., Nishioka T., Kanehisa M. LIGAND: chemical database for enzyme reactions // Bioinformatic. 1998, 14:591—599.

Goto S., Okuno Y., Hattori M., Nishioka T., Kanehisa M. LIGAND: database of chemical compounds and reactions in biological pathways // Nucleic Acids Res. 2002, 30:402—404.

Hamadeh H.K., Amin R.P., Paules R.S., Afshari C.A. An overview of toxicogenomics // Curr Issues Mol Biol. 2002, 4:45—56.

Hamadeh H.K., Bushel P., Martin K., Bennett L., Paules R., Afshari C.A. Detection of diluted gene expression alterations using cDNA microarrays // BioTechniques. 2002, 32:322—329.

Hamadeh H.K., Bushel P.B., Jayadev S., DiSorbo O., Bennett L., Li L., Tennant R., Stoll R., Barrett J.C., Blanchard K., Paules R.S., Afshari C.A. Prediction of compound signature using high density gene expression profiling // Toxicol Sci. 2002, 67:232—240.

Hamadeh H.K., Bushel P.B., Jayadev S., Martin K., DiSorbo O., Sieber S., Bennett L., Tennant R., Stoll R., Barrett

- J.C., Blanchard K., Paules R.S., Afshari C.A.* Gene expression analysis reveals chemical-specific profiles // *Toxicol Sci.* 2002, 67:219—231.
- Hamadeh H.K., Knight B.L., Haugen A.C., Sieber S., Amin R.P., Bushel P., Stoll R., Blanchard K., Jayadev S., Tennant R., Cunningham M., Afshari C.A., Paules R.P.* Methapyrilene toxicity: anchorage of pathologic observations to gene expression alterations // *Toxicol Pathol.* 2002, 30(4):470—482.
- Hamadeh H.K., Li L., Stoltz J., Bushel P.R., Stoll R., Blanchard K., Jayadev S., Afshari C.A.* Elucidation of signal versus effect in toxicogenomic studies // *App Genomics Proteomics.* 2002, 1(2):109—121.
- Han W.K., Bailly V., Abichandani R., Thadhani R., Bonventre J.V.* Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury // *Kidney Int.* 2002, 62(1):237—244.
- Holmes E., Nicholls A.W., Lindon J.C., Ramos S., Spraul M., Neidig P., Connor S.C., Connelly J., Damment S.J.P., Haselden J., Nicholson J.K.* Development of a model for classification of toxin-induced lesions using H-1 NMR spectroscopy of urine combined with pattern recognition // *NMR in Biomed.* 1998, 11:235—244.
- Jeffrey F.M., Roach J.S., Storey C.J., Sherry A.D., Malloy C.R.* ¹³C isotopomer analysis of glutamate by tandem mass spectrometry // *Anal Biochem.* 2002, 300:192—205.
- Jones J.G., Perdigoto R., Rodrigues T.B., Geraldles C.F.G.C.* Quantitation of absolute H-2 enrichment of plasma glucose by H-2 NMR analysis of its monoacetone derivative // *Magn Reson Med.* 2002, 48:535—539.
- Jones J.G., Solomon M.A., Cole S.M., Sherry A.D., Malloy C.R.* An integrated ²H and ¹³C NMR study of gluconeogenesis and TCA cycle flux in humans // *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001, 281:848—856.
- Kaletin G.I., Kaletina N.I., Brusilovskiy A.I.* New methods of detection of metabolic markers that indicate abnormalities of metal ligand homeostasis // *Микроэлементы в медицине.* 2010. Т.11. Вып. 2. С.10.
- Kristal B.S., Vigneau-Callahan K., Matson W.R.* Simultaneous analysis of multiple redox-active metabolites from biological matrices // *Methods Mol Biol.* 2002, 186:185—194.
- Lindon J.C., Holmes E., Nicholson J.K.* Pattern recognition methods and applications in biomedical magnetic resonance // *Progr NMR Spectrosc.* 2001, 39:1—40.
- Lindon J.C., Nicholson J.K., Holmes E., Everett J.R.* Metabonomics: metabolic processes studied by NMR spectroscopy of biofluids // *Concepts Magn Reson.* 2000, 12:289—320.
- London R.E., Gabel S.A.* A deuterium surface coil NMR study of the metabolism of D-methionine in the liver of the anesthetized rat // *Biochemistry.* 1988, 27:7864—7869.
- Luhe A., Hildebrand H., Bach U., Dingermann T., Ahr H.-J.* A new approach to studying ochratoxin A (OTA)-induced nephrotoxicity: expression profiling in vivo and in vitro employing cDNA microarrays // *Toxicol Sci.* 2003, 73:315—328.
- Mahlknecht U., Voelter-Mahlknecht S.* Pharmacogenomics: questions and concerns. // *Curr Med Res Opin.* 2005, 21(7):1041—1047.
- McGehee R.E., Ronis M.J.J., Cowherd R.M., Ingelmansundberg M., Badger T.M.* Characterization of cytochrome-P450 2E1 induction in a rat hepatoma FGC-4 cell model by ethanol // *Biochem Pharmacol.* 1994, 48:1823—1833.
- Nicholls A.W., Holmes E., Lindon J.C., Shockcor J.P., Farrant R.D., Haselden J.N., Damment S.J.R., Waterfield C.J., Nicholson J.K.* Metabonomic investigations into hydrazine toxicity in the rat // *Chem Res Toxicol.* 2001, 14:975—987.
- Nicholson J.K., Connelly J., Lindon J.C., Holmes E.* Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. // *Nat Rev Drug Discov.* 2002, 1:153—161.
- Nicholson J.K., Lindon J.C., Holmes E.* «Metabonomics»: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR // *Xenohotica.* 1999, 11:1181—1189.
- Nicholson J.K., Timbrell J.A., Sadler P.J.* Proton NMR spectra of urine as indicators of renal damage mercury-induced toxicity in rats // *Mol Pharm.* 1985, 27:644—651.
- Nicholson J.K., Wilson I.D.* High resolution proton magnetic resonance spectroscopy of biological fluids // *Mol Pharm.* 1989, 21:449—501.
- Osborne T.F.* Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): key regulators of nutritional homeostasis and insulin action // *J Biol Chem.* 2000, 275:32379—32382.
- Pitt J.J., Eggington M., Kahler S.G.* Comprehensive screening of urine samples for inborn errors of metabolism by electrospray tandem mass spectrometry // *Clin Chem.* 2002, 48:1970—1980.
- Rezzy S., Francois-Pierre J., Nicholson J.* Metabolic shifts due to long-term caloric restriction revealed in nonhuman primates // *Experimental gerontology.* 2009, 44(5):356—362.
- Rossi D.T., Sinz M.W.* Mass spectrometry in drug discovery. New York: Marcel Dekker, 2002. 432 p.
- Selman C., Kerrison N.D., Cooray A., Piper M.D.W., Lingard S.J., Barton R.H., Schuster E.F., Blanc E., Gems D., Nicholson J.K., Thornton J.M., Partridge L., Withers D.J.* Coordinated multi-tissue transcriptional and plasma metabonomic profiles following acute caloric restriction in mice // *Physiol Genomics.* 2006, 27:187—200.
- Seshadri V., Fox P.L., Mukhopadhyay C.K.* Dual role of insulin in transcriptional regulation of the acute phase reactant ceruloplasmin // *J Biol Chem.* 2002, 277(31):27903—27911.
- Shi H., Vigneau-Callahan K.E., Shestopalov A.I., Milbury P.E., Matson W.R., Kristal B.S.* Characterization of diet-dependent metabolic serotypes: primary validation of male and female serotypes in independent cohorts of rats // *J Nutr.* 2002, 132:1039—1046.
- Shockcor J.P., Holmes E.* Metabonomic applications in toxicity screening and disease diagnosis // *Curr Topics Med Chem.* 2002, 2:35—51.

- Sim K.G., Hammond J., Wilcken B.* Strategies for the diagnosis of mitochondrial fatty acid beta-oxidation disorders // *Clin Chim Acta.* 2002, 323:37–58.
- Tate A.R., Damment S.J.P., Lindon J.C.* Investigation of the metabolite variation in control rat urine using 1H NMR spectroscopy // *Anal Biochem.* 2001, 291:17–26.
- Tweeddale H., Notley-McRobb L., Ferenci T.* Effect of slow growth on metabolism of *Escherichia coli*, as revealed by global metabolite pool («metabolome») analysis // *J Bacteriol.* 1998, 180:5109–5116.
- Wagner R.F., Beiden S.V., Campbell G., Metz C.E., Sacks W.M.* Assessment of medical imaging and computer-assisted systems: lessons from recent experience // *Acad Radiol.* 2002, 9(11):1264–1277.
- Wang Y., Lawler D., Larson B., Ramadan Z., Kochhar S., Holmes E., Nicholson J.K.* Metabonomic Investigations of Aging and Calorie Restriction in a Life-Long Dog Study // *J Proteome Res.* 2007, 6:1846–1854.
- Waring J.F., Cavet G., Jolly R.A., McDowell J., Dai H., Ciurlionis R., Zhang C., Stoughton R., Lum P., Ferguson A., Roberts C.J., Ulrich R.G.* Development of a DNA microarray for toxicology based on hepatotoxin-regulated sequences // *EHP i cogenomics.* 2003, 111:53–60.
- Waring J.F., Ciurlionis R., Jolly R.A., Heindel M., Ulrich R.G.* Microarray analysis of hepatotoxins in vitro reveals a correlation between gene expression profiles and mechanisms of toxicity // *Toxicol Lett.* 2001, 120(1-3):359–368.
- Waring J.F., Jolly R.A., Ciurlionis R., Lum P.Y., Praestgaard J.T., Morfitt D.C., Buratto B., Roberts C., Schadt E., Ulrich R.G.* Clustering of hepatotoxins based on mechanism of toxicity using gene expression profiles // *Toxicol Appl Pharm.* 2001, 175(1):28–42.
- Waters N.J., Holmes E., Waterfield C.J., Farrant R.D., Nicholson J.K.* NMR and pattern recognition studies on liver extracts and intact livers from rats treated with naphthyl-1-thiocyanate // *Biochem Pharmacol.* 2002, 64:1–11.
- Watkins S.M., Reifsnnyder P.R., Pan H.J., German J.B., Leiter E.H.* Lipid metabolome wide effects of the PPARgamma agonist rosiglitazone // *Lipid Res.* 2002, 43:1809–1817.
- Willoughby R., Sheehan E., Mitrovich S.* A global view of LC/MS. 2nd ed. Pittsburgh, PA: Global View Publishing. 2002, 518 p.
- Xu J., Xiao G., Trujillo C., Chang V., Blanco L., Joseph S.B., Bassilian S., Saad M.F., Tontonoz P., Lee W.N., Kurland I.J.* Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) influences substrate utilization for hepatic glucose production // *Biol Chem.* 2002, 277:50237–50244.